



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO
NUEVAS ESTRATEGIAS BIOCATALÍTICAS
PARA LA OBTENCIÓN DE MOLÉCULAS DE
INTERÉS EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA:
DILTIAZEM

Autor: Laura Taina González

Tutor: Andrés R. Alcántara León

Convocatoria: Junio

RESUMEN

Las estrategias de síntesis de compuestos farmacológicos o químicos han ido cambiando con el desarrollo de la ciencia. En este ámbito, la biocatálisis ha supuesto un gran avance en la obtención de moléculas de interés para la industria farmacéutica. Gracias a todas sus ventajas, entre las que destaca el cumplimiento de los 12 principios de la Química Verde o Química Sostenible, está en continuo crecimiento. Una de las moléculas obtenidas gracias a esta metodología es el diltiazem, fármaco perteneciente al grupo de los antagonistas de calcio, utilizado para tratar las arritmias, entre otras patologías.

Las enfermedades cardiovasculares suponen un importante reto en cuanto a su tratamiento se refiere, pues el número de personas con patologías de este tipo, como infarto de miocardio, hipertensión arterial o arritmias, aumenta con el paso de los años. Como dato, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer son la principal causa de muerte en los países desarrollados.

Este trabajo se centra en la explicación detallada de la reacción biocatalítica llevada a cabo para sintetizar el diltiazem. Se revisa el tipo de reacción y las enzimas utilizadas para ello, así como el fundamento tanto químico como biotecnológico. Se abordan además los 12 principios de la Química Verde, y cómo la biocatálisis contribuye a la sostenibilidad.

Palabras clave: biocatálisis, diltiazem, Química Verde, lipasas.

ABSTRACT

Drugs synthesis strategies have been changing with the development of science. In this term, biocatalysis has been a big advance for the Pharmaceutical Industry. It is in continued growth thanks to all the advantages, in which is included the fulfillment of the '12 Principles of Green Chemistry'. One of the molecules obtained by this kind of method is diltiazem, drug which is included in the pharmacological group of 'Calcium Antagonists' and it is used to treat different kinds of arrhythmia, among others.

The treatment of cardiovascular diseases is a big challenge nowadays because the number of people who develop these kind of illnesses is increasing year by year. Cardiovascular diseases and cancer are the two main reasons of death in the developed countries.

This revision focusses on the detailed reaction used to obtain diltiazem, as well as the enzymes used for it. Also, it is discussed the main advantage of this kind of chemistry and the 12 Principles of Green Chemistry, and how Biocatalysis contributes to environmental sustainability.

Key words: biocatalysis, diltiazem, Green Chemistry, lipases.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La **biotecnología**, según la Sociedad Española de Biotecnología, es '*la aplicación de los principios científicos y técnicos al procesamiento de materiales por agentes biológicos con el fin de suministrar bienes y servicios*'. [1] Se divide en diferentes subtipos en función del área de aplicación de la misma, y sigue además un código de colores. La biotecnología roja es aquella que comprende las aplicaciones terapéuticas diagnósticas, de salud animal y de investigación biomédica. La blanca, por su parte, se refiere a la aplicación de la biotecnología en el área industrial. Existen otros muchos tipos entre los que destacan la biotecnología verde (vegetal), la azul (marina), gris (ambiental) o amarilla (nutricional).

La biotecnología engloba la **biocatálisis**; que se puede definir como la utilización de *biocatalizadores* de cualquier tipo (enzimas, células enteras, orgánulos...) para la transformación de sustratos no naturales para ese biocatalizador. Si se aplica esto al ámbito de la síntesis farmacéutica, la biocatálisis aplicada consiste, por tanto, en el uso de enzimas obtenidas por métodos biotecnológicos como catalizadores de reacciones de síntesis de algún sintón esencial o del mismo fármaco.

El empleo de biocatalizadores conlleva una serie de ventajas [2] :

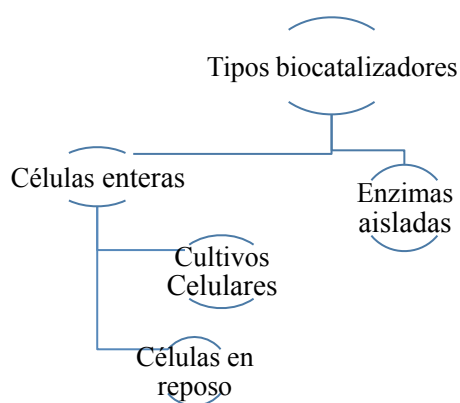
1. Son catalizadores eficientes, que son capaces de actuar en intervalos de temperatura y presión moderados, minimizando los costes de producción.
2. Presentan una elevada precisión enzimática, son regio-, quimio- y enantioselectivos; conceptos que se explicarán más adelante. Esto permite que actúen sobre una gran variedad de sustratos.
3. Pueden catalizar un extenso abanico de reacciones.
4. Las reacciones biocatalizadas cumplen con los principios de la Química Verde, por lo que son muy compatibles con el medio ambiente. Estos principios se detallan en la conclusión de este trabajo.
5. Son, además, biodegradables.
6. Las enzimas pueden ser sobreexpresadas, por lo que hacen de los procesos biotecnológicos procesos económicamente eficientes.

Como ya se ha comentado, la enzima no actúa en su medio natural por lo que surgen nuevos conceptos que denotan las ventajas descritas; como el de la *promiscuidad catalítica* que se refiere precisamente a esto.

Cuando se habla de promiscuidad de condiciones de reacción se refiere a que dicho enzima es capaz de ser eficaz en la transformación que está llevando a cabo, a pesar de que se

modifique el pH o el solvente en el que se está trabajando. Por ejemplo, una hidrolasa en medio no acuoso. La promiscuidad de sustrato, por otro lado, se refiere a la capacidad del enzima para actuar sobre diferentes sustratos, sobre los que no actuarían en medio natural. Como ejemplo se pueden mencionar las lipasas que hidrolizan triglicéridos compuestos por ácidos grasos no naturales. Por último, existe también el concepto de promiscuidad de sitio alterado, el cual se refiere a la posibilidad de que la enzima posea otro sitio dentro su estructura tridimensional que pueda actuar como centro activo.

En cuanto al uso de los distintos tipos de biocatalizador es posible dividir las reacciones biocatalíticas según se utilicen enzimas aisladas o células enteras.



Esquema 1. Tipos de biocatalizadores

En el caso de que se utilicen **células enteras**, se pueden utilizar cultivos celulares en crecimiento o células en reposo. En ambos casos no es necesario emplear cofactores en reacciones que así lo requieran, pues el metabolismo de la propia célula proporcionará todo lo necesario para que la reacción se lleve a cabo.

En el primer caso, el empleo de cultivos celulares en crecimiento, se consiguen grandes

actividades enzimáticas, puesto que la enzima se encuentra en su medio natural; pero son procesos difíciles de controlar debido a la gran generación de productos secundarios y de biomasa procedentes de otras reacciones que se estén dando en la célula. Por el contrario, si se utilizan células en reposo, la generación de dichos productos secundarios será menor, pero también será menor la actividad enzimática. Como principal ventaja se puede mencionar la mayor facilidad de manejo de estos sistemas.

En el caso del uso de **enzimas aisladas** la productividad será mayor, pero en el caso de que la reacción requiera cofactor, como por ejemplo una reacción redox, es necesario suministrárselo. Las enzimas aisladas que trabajan en solventes acuosos consiguen altos valores de actividad enzimática, pero, al igual que ocurre con los cultivos celulares, se complica la extracción al haber reacciones secundarias. Aquellas que son capaces de actuar en disolventes orgánicos tienen menor actividad, pero la recuperación de la enzima es más fácil [3].

Para poder aprovechar al máximo el rendimiento de un biocatalizador, es necesaria la **inmovilización**. En la Conferencia de Ingeniería Enzimática que tuvo lugar en Henniker, New Hampshire, en 1971 se definió este concepto como *‘El confinamiento físico de una enzima o célula - en una determinada región del espacio - para dar lugar a formas insolubles, de manera que su actividad catalítica se retenga y pueda ser reutilizada.’*

La inmovilización resuelve las tres principales desventajas de las reacciones biocatalíticas, que son las siguientes [4]:

- Muchas enzimas no son suficientemente estables en las condiciones en las que la reacción se ha de llevar a cabo, y pueden perder, por consiguiente, la actividad catalítica.
- La reutilización de las enzimas es un problema ya que son moléculas solubles en agua y su extracción y separación de los sustratos y productos es difícil una vez que ha finalizado la reacción. La reutilización es necesaria para asegurar el beneficio económico.
- La productividad de un proceso industrial suele ser baja, debido a la baja tolerancia de las enzimas a altas concentraciones de sustratos y productos. Esto no permite trabajar con grandes cantidades de reactivos, por lo que se entorpece el proceso.

Dependiendo de la técnica de inmovilización, las propiedades biocatalíticas como estabilidad, selectividad, K_{cat} y K_m , pH y características de temperatura pueden verse alteradas. [4]

A continuación se presenta un esquema de los tipos y subtipos de inmovilización según los tipos de enlaces que se presentan, haciendo hincapié en la adsorción; pues es el método empleado en la reacción a estudio.



Esquema 2. Tipos de Inmovilización.

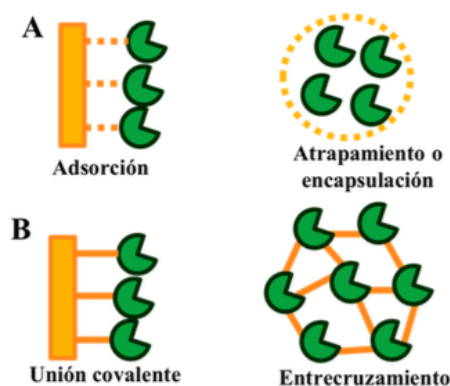


Figura 1. Métodos de Inmovilización.

(A) Retención física B) I. química. [5]

La retención física consiste en llevar a cabo el confinamiento de la enzima sin formación de enlaces covalentes, como sí ocurre en la inmovilización química. Hay dos grandes tipos de retención física, la adsorción y el atrapamiento.

La **adsorción** de un biocatalizador sobre un transportador insoluble en agua es el método más fácil. Puede ser aplicado tanto para enzimas aisladas como para células viables. El transportador sobre el cual se inmoviliza la enzima puede estar formado por materiales inorgánicos u orgánicos, entre los que destacan el carbón activo, alúmina, sílice, tierra de diatomeas o vidrio. Es una interacción física y no específica, en la cual se dan fuerzas de van der Waals, interacciones iónicas o puentes de hidrógeno, fuerzas que son débiles en comparación con la unión covalente de la inmovilización química. Precisamente gracias a esto las pérdidas de actividad enzimática son bajas, pero en contrapartida, la desorción de la enzima del transportador puede ser causada por pequeñas variaciones en los parámetros de la reacción.

Cabe destacar que en los casos en los que la interacción es iónica, aunque este tipo de enlaces sean más fuertes que la adsorción física, es un método muy susceptible a la presencia de otros iones. Por tanto, es necesario mantener las concentraciones iónicas y el pH equilibrados para evitar la desorción. [4]

El segundo gran tipo de inmovilización es la inmovilización química, en la cual existe la formación de enlaces covalentes, lo que genera una gran estabilización de la enzima. Debido a que se dan reacciones químicas entre la enzima y el soporte, este tipo de inmovilización ha de llevarse a cabo a través de residuos enzimáticos no esenciales, es decir, aquellos que no se encuentren en el centro activo; puesto que si esto ocurre se perderá la actividad enzimática. Para ello, se requiere un gran conocimiento de la estructura primaria, secundaria y terciaria de la enzima; por lo que es una metodología particular de cada enzima. Los dos subtipos son la inmovilización por enlace covalente y el ‘crosslinking’. [3]

El enlace covalente de la enzima con el soporte siempre lleva a una pérdida de actividad catalítica; puesto que la enzima ya debe llevar a cabo una reacción. Por su parte, el entrecruzamiento o ‘crosslinking’ permite acabar con el inconveniente del uso de un soporte y consiste en la formación de enlaces también covalentes entre las enzimas y entre la enzima con el soporte. La interacción entre enzimas puede ser directa o mediante un ‘rellenador’ inactivo, como por ejemplo albúmina. [3,4]

Molécula obtenida: Diltiazem

El fármaco que se obtiene gracias al empleo de este método es el diltiazem, que pertenece al grupo de los Antagonistas de Calcio. Son fármacos ampliamente utilizados a nivel mundial para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, como por ejemplo la hipertensión arterial o las arritmias. Este tipo de enfermedades están ampliamente distribuidas por el mundo, de tal manera que su tratamiento es de vital importancia para la mejora de las condiciones de vida. La hipertensión arterial en concreto, además de ser un problema en sí misma, constituye no solo un importante factor de riesgo para el desarrollo de otras patologías cardíacas sino también de patologías metabólicas como la diabetes tipo II.

El mecanismo de acción de estos fármacos se basa en el bloqueo de los canales tipo L – controlados por voltaje –, de tal manera que impiden su apertura, por lo que la entrada de calcio a la célula queda restringida; bloqueándose así la transmisión del impulso nervioso responsable de la contracción. En los vasos sanguíneos, por tanto, inducirán vasodilatación, y en el corazón bloquearán contracción [6].

OBJETIVOS

El objetivo de esta revisión bibliográfica es dar a conocer la importancia de las nuevas estrategias de síntesis de moléculas farmacológicamente activas, poniendo como ejemplo la obtención del diltiazem utilizando dos lipasas procedentes de diferentes microorganismos.

Además, se pretende destacar que existen metodologías compatibles con el medio ambiente y que siguen los principios de la Química Sostenible.

METODOLOGÍA

Para la realización de este trabajo se han utilizado diferentes fuentes bibliográficas, tanto bases de datos electrónicas como libros.

En cuanto a las bases de datos utilizadas destaca SciFinder, Bucea y Cisne. También se ha empleado la base de datos PubMed para datos clínicos sobre los fármacos tratados. Como herramienta para la búsqueda de otros artículos se ha empleado Google Académico.

La bibliografía sigue las normas APA, con el fin de facilitar al lector la búsqueda de los artículos utilizados.

Las palabras clave utilizadas para buscar información fueron: biocatálisis, lipasas, diltiazem, *Serratia marcescens*, *Rhizomucor miehei*, química verde.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Entre las diferentes metodologías para la obtención de enantiómeros puros cabe destacar la creciente importancia de la biocatálisis. En los últimos años se ha producido un aumento en la utilización de enzimas aisladas o microorganismos para la transformación de múltiples sustratos con elevada quimio-, regio- y enantioselectividad [2].

Según María J. Hernáiz [2], las enzimas son por naturaleza materiales quirales, por lo que pueden ser utilizadas para obtener sustancias ópticamente activas con un elevado exceso enantiomérico a partir de mezclas racémicas, como es el caso del trabajo. El fundamento de este proceso es la utilización de una lipasa inmovilizada para hidrolizar aquel enantiómero que no interesa, y por tanto conservar aquel producto que tiene utilidad como sintón en la posterior obtención del diltiazem.

A continuación, se detalla el **fundamento químico** del proceso. Se trata de una resolución cinética de una mezcla racémica gracias a la hidrólisis de un epoxi-éster quiral, porque solo uno de los enantiómeros es hidrolizado. El exceso enantiomérico, exceso de un enantiómero sobre el otro, del (2S,3R)-metil-*p*-metoxifenil glicinato – **50** – es mayor del 98% [7]. Esto quiere decir que se obtiene, como mínimo, un 99% del enantiómero deseado, y un 1% del ácido.

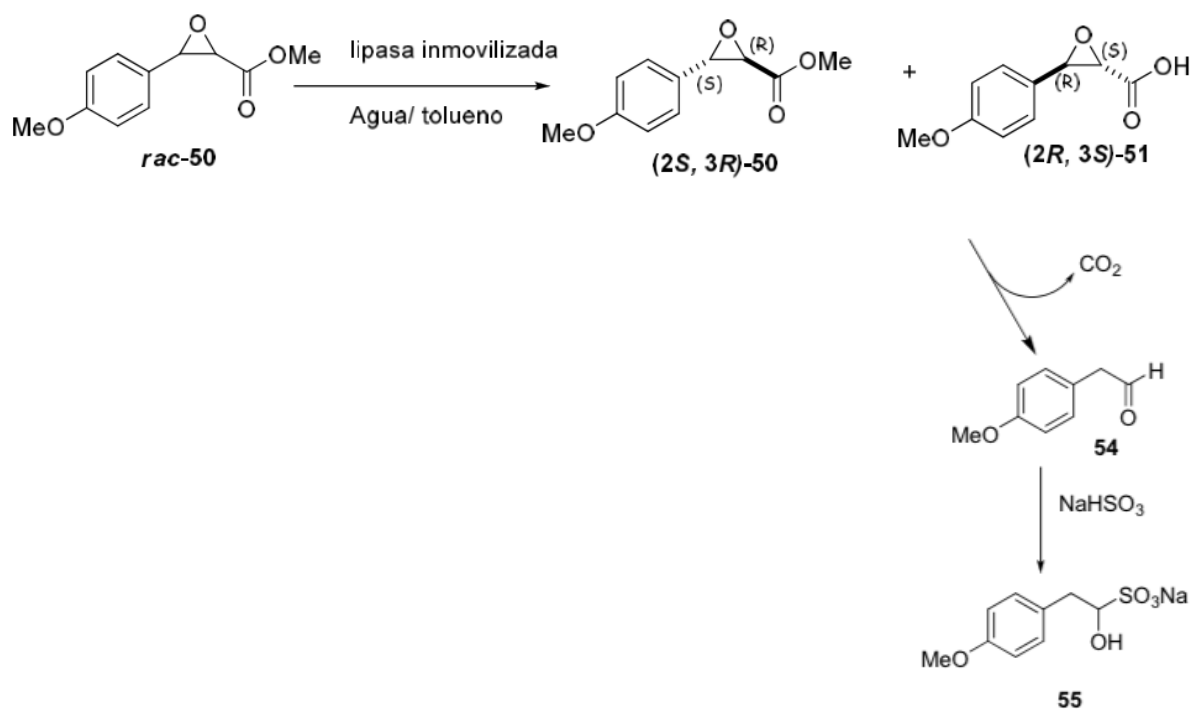


Figura 2. Química del proceso. [9]

La lipasa cataliza la hidrólisis de una mezcla racémica del éster metílico del ácido *trans*-3-(4-metoxifenil) glicídico o **Rac-50** para conseguir separar el enantiómero deseado, el éster metílico del ácido (2S, 3R)-*trans*-3-(4-metoxifenil)-glicídico, o **(2S, 3R)-50**. [9]

Como producto de la hidrólisis enantioselectiva se origina el ácido (2R,3S)-3-(4-metoxifenil)-glicídico o **(2R, 3S)-51**, que descarboxila espontáneamente y da lugar al aldehído correspondiente. Este aldehído se ha de eliminar puesto que inhibe fuertemente a la enzima. Se puede eliminar mediante la formación de un derivado bisulfítico al añadir bisulfito. Además, este reactivo también ayuda a mantener los valores de pH constantes. [8,9] Para la obtención de este sintón se emplean dos lipasas procedentes de diferentes microorganismos. Una de ellas procede del hongo *Rhizomucor miehei* (RML) y la otra enzima tiene origen bacteriano y procede de *Serratia marcescens* (Sr41 8000). La primera de ellas es utilizada por la compañía DSM-Andeno, y la segunda por Tanabe [9]. Este trabajo se centrará en la revisión del proceso llevado a cabo por Tanabe, aunque el fundamento de la reacción es el mismo para ambas enzimas .

Papel e importancia de las lipasas como biocatalizadores

Las lipasas son enzimas pertenecientes al grupo de las hidrolasas, y catalizan la hidrólisis de ésteres formados a partir de ácidos grasos de cadena larga y de glicerol. Gracias a su estabilidad en medios orgánicos, su elevada quimio – , regio – , y enantioselectividad, el hecho de que no requieran cofactores y el amplio espectro de sustratos que pueden transformar suelen ser el biocatalizador de elección en muchas reacciones [2]. Antes de continuar, es importante explicar el significado de los conceptos nombrados anteriormente para destacar la importancia de estas enzimas.

Cuando se habla de **quimioselectividad** de una enzima se habla de la capacidad que tiene la enzima para actuar sobre un determinado grupo funcional, aunque en el sustrato de la reacción existan más grupos sobre los que podría actuar.

Por otro lado, la **regioselectividad** se refiere a que en el caso de que hubiera varios grupos funcionales con características químicas parecidas, debido a la región donde están situados solo reaccionaría uno; incluso cuando se tratara de grupos con la misma reactividad.

La **enantioselectividad**, por su parte, consiste en la capacidad de la enzima para discernir entre dos enantiómeros. Esta, precisamente, es la cualidad más importante que tiene la lipasa de estudio, pues la reacción está basada precisamente en la capacidad para distinguir enantiómeros de una mezcla racémica y actuar solo sobre uno de ellos.

Existe una gran variedad de organismos (bacterias, hongos filamentosos o levaduras) a partir de los cuales se pueden obtener lipasas, entre ellos destacan *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus* o *Candida* [10].

Mecanismo de acción de las lipasas

Para entender el funcionamiento e importancia, es necesario revisar su particular mecanismo de acción. En primer lugar, se explica el mecanismo de acción desde un punto de vista estructural; para desarrollar posteriormente su mecanismo de acción químico.

Las lipasas en la naturaleza hidrolizan sustratos muy hidrofóbicos, como grasas o aceites. En medios homogéneos tienen su centro activo aislado del medio, protegido por una cubierta que impide la entrada al sustrato [11]. Esta cubierta puede ser una hélice alfa anfifílica o un lazo. Por tanto, la estructura nativa de las lipasas es un sistema que se encuentra en continua conversión entre la estructura cerrada y la estructura abierta (*Figura 3*), la cual se estabiliza en las interfaces lípido-agua [12].

En medios acuosos, los residuos hidrofílicos se encuentran orientados hacia el exterior, mientras que los hidrofóbicos lo hacen hacia el interior de la enzima.

Las lipasas en su conformación activa, presentan en su centro activo un grupo de residuos hidrofóbicos, y alrededor de la entrada al centro activo también aparece una superficie significativamente apolar. Además, existen algunas moléculas de agua que participan en interacciones importantes y necesarias para mantener la conformación del sitio activo catalíticamente viable [12].

Las lipasas en general requieren la denominada ‘*activación interfacial*’ para utilizar el máximo de su actividad catalítica. Este fenómeno consiste en el incremento de la actividad enzimática en presencia de una interfaz lípido-agua. Ante la presencia de una gota de aceite, la alfa hélice se mueve para permitir la interacción entre la cara interna hidrofóbica y la interfaz hidrofóbica. Este desplazamiento ocurre gracias a que, cuando se forma una interfaz, se modifica el ambiente dieléctrico del medio, y se potencian las interacciones electroestáticas; lo que permite que la cubierta se desplace. Así, la lipasa queda adsorbida a la interfaz, y el centro activo es expuesto al medio de reacción (forma abierta). [11,12]

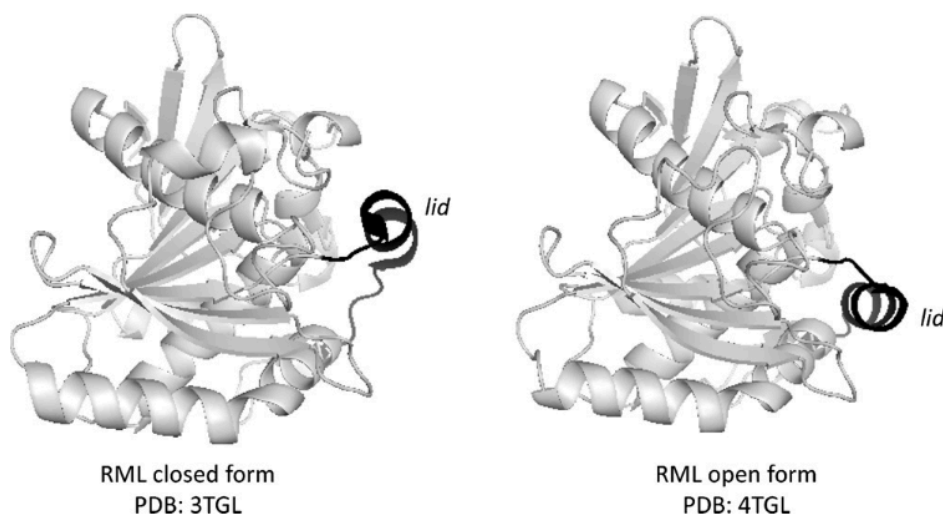


Fig. 1. Structure of open and closed forms of RML. The 3D structure was obtained from the Protein Data Bank (PDB) using Pymol vs. 0.99.

Figura 3. Estructuras abiertas y cerradas de la lipasa de Rhizomucor miehei. [11]

En cuanto al mecanismo de acción catalítico de las lipasas, se lleva a cabo por medio de aminoácidos que conforman la denominada ‘triada catalítica’ (*Figura 4*). Estos tres aminoácidos son el Aspartato (Asp), la Histidina (His) y la Serina (Ser).

Como explica M. J. Hernáiz [2], en primer lugar se activa el grupo hidroxilo de la Ser, activación que ocurre gracias a que los tres aminoácidos se encuentran colocados espacialmente en el centro activo de tal manera que se permite el flujo de electrones. El protón del grupo hidroxilo de la Ser es captado por el nitrógeno del anillo imidazólico de la His, cuya carga positiva se ha estabilizado por el Asp. El sustrato accede al sitio activo de la enzima, formando el complejo enzima-sustrato, situándose de tal manera que el carbono carbonílico es atacado por la Ser activada. Se forma así el intermedio tetraédrico I. La carga situada en el oxígeno de la Ser se transloca hacia el oxígeno del grupo carbonilo, por lo que se forma un oxoanión, que es estabilizado por puentes de hidrógeno. A continuación, se transfiere al oxígeno del alcohol saliente el protón que previamente se cede a la His, liberándose el alcohol y formándose el complejo acil-enzima.

Después, se produce un segundo ataque nucleofílico por parte del segundo sustrato, que en sistemas biológicos se trata del agua, previa activación de la triada catalítica, formándose un nuevo intermedio tetraédrico (II). La histidina capta un protón del nuevo nucleófilo atacante, que después cede a la serina. Se libera el producto y se regenera la triada catalítica.

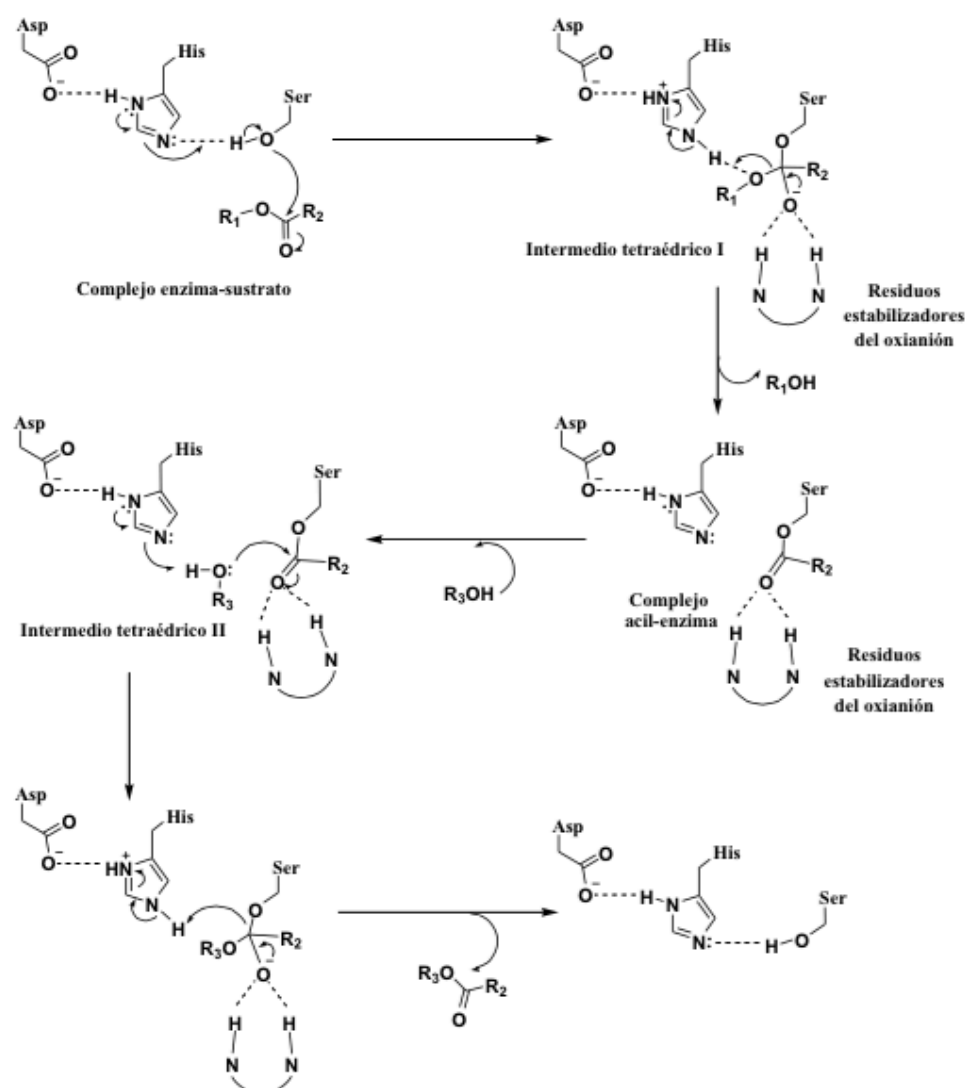


Figura 4. Mecanismo catalítico de las lipasas. [2]

En cuanto a la **inmovilización de las lipasas**, los soportes hidrofóbicos imitan los sustratos sobre los que actúan de manera natural estas enzimas, permitiendo la adsorción de la forma abierta de la lipasa sobre el soporte por medio de la activación interfacial. Un ejemplo de una lipasa que se suele inmovilizar con este tipo de soportes es la de *Rhizomucor miehei* (Figura 5). Sin embargo, también es posible inmovilizar lipasas sobre soportes hidrofílicos, como es el caso de la lipasa secretada por *Serratia marcescens*.

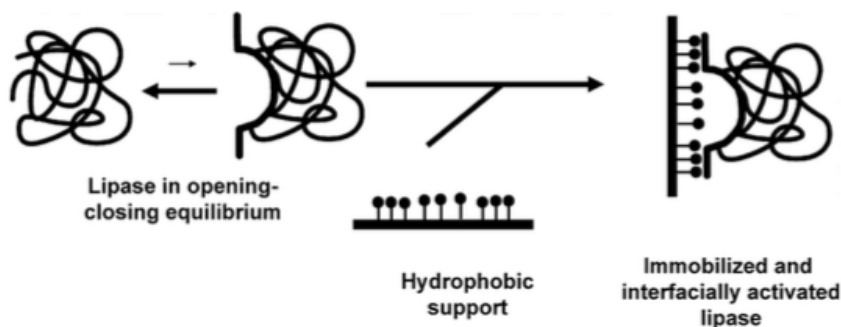


Fig. 6. Immobilization of lipases via interfacial activation on hydrophobic supports.

Figura 5. Inmovilización de las lipasas por medio de la activación interfacial. [11]

Con respecto a la enzima secretada por *Rhizomucor miehei* fue descrita por primera vez en 1973. Es una enzima extracelular cuya masa molecular es de 31.600 Da y se usó por primera vez en industria alimentaria [11].

Hoy en día se encuentra comercializada por Novozymes, en su forma libre o en su forma inmovilizada. El mecanismo de activación interfacial ha sido ampliamente estudiado.

Uno de los métodos más empleados para inmovilizar lipasas es el uso de transportadores hidrofóbicos. RML ha sido inmovilizada sobre una gran variedad de soportes hidrofóbicos o soportes rodeados de una capa hidrofílica, por ejemplo, geles de agarosa, resinas acrílicas o silicatos. Se ha visto que este tipo de inmovilización crea un ambiente hidrofóbico alrededor del centro activo de la enzima que aumenta la especificidad hacia los compuestos hidrofóbicos. Además, cambiando el soporte y su lipofilia es posible controlar la fuerza de adsorción de la enzima al soporte, su actividad catalítica e incluso la selectividad de la lipasa [11].

Síntesis biocatalítica utilizando *Serratia marcescens*

La otra enzima utilizada para la producción de este compuesto esencial en la síntesis del diltiazem es la lipasa secretada por *Serratia marcescens*.

Serratia marcescens es un bacilo gram negativo que pertenece a la familia *Enterobacidae* y que es capaz de secretar extracelularmente esta enzima, por lo que facilita de una manera importante su purificación.

Para explicar el fundamento biocatalítico de esta reacción, se ha elegido el proceso llevado a cabo con dicha enzima. Este proceso emplea un reactor de membrana en el que se combinan tres procesos: la hidrólisis, la separación y la cristalización del producto deseado, según la Figura 5 [9].

El reactor posee una membrana de fibra hueca de poliacrilonitrilo, que está compuesta por dos capas espesas en el lumen y una esponjosa en la parte central. El poliacrilonitrilo es un material hidrofílico, por lo que en este caso no se utiliza para la inmovilización, como en el caso de la lipasa de *Rhizomucor miehei*, un materia hidrofóbico. La lipasa se encuentra disuelta e inmovilizada por adsorción presurizada en la capa esponjosa de la membrana [8].

Las condiciones de la reacción se detallan en la siguiente tabla:

[Rac-50]	<0.6 M, <125 g/L [208.21 g · mol ⁻¹]
pH	8.5
Temperatura	22 °C
Medio	Bifásico: agua/tolueno
Tipo de reacción	Hidrólisis de un éster carboxílico
Catalizador	Lipasa inmovilizada por adsorción
Cepa	<i>Serratia marcescens</i> Sr 41 8000
V_{máx} para la hidrólisis	1.7 U · mg _{proteína} ⁻¹

Tabla 1. Condiciones de reacción. [8]

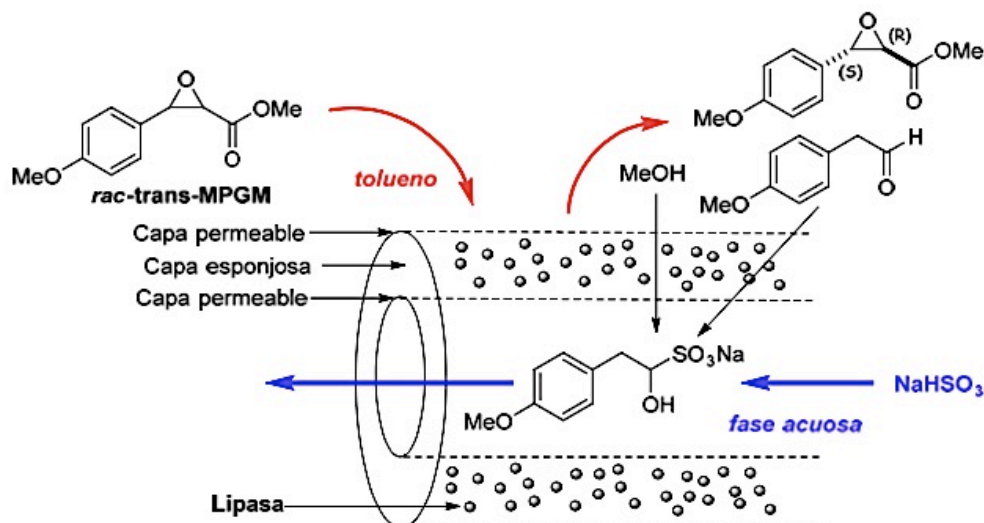


Figura 6. Modelo de reacción. [3]

El tolueno disuelve el sustrato racémico en el cristalizador y lo lleva hacia la membrana, donde se encuentra la lipasa inmovilizada. Tras pasar la capa permeable, se pone en contacto con la zona esponjosa y es ahora cuando se produce la hidrólisis. Como resultado se obtienen los dos productos, uno el deseado, *(2S, 3R)-50*; y el otro el ácido producto de la hidrólisis,

(**2R, 3S**)-**51**. Este, al ser un ácido, es soluble en agua y por tanto pasa la membrana y llega a la fase acuosa. Debido a su inestabilidad, descarboxila espontáneamente y da lugar al aldehído correspondiente; el cual reacciona con el bisulfito de la fase acuosa. Esto, como ya se ha comentado, es de vital importancia ya que el aldehído inhibiría la enzima [8,9].

Por su parte, el (**2S, 3R**)-**50** permanece en la fase tolueno y se lleva hasta el cristizador, donde se recogerá [8,9].

La lipasa es inhibida por Co^{+2} , Ni^{+2} , Fe^{+3} , Fe^{+2} y EDTA; pero es activada por Ca^{+2} y Li^{+} . [8]

La actividad de la enzima disminuye significativamente después de 8 ciclos, y la membrana puede ser recargada de lipasa adicional. [9]

El rendimiento del producto cristalizado es mayor al 43%, con un 100% de pureza enantiomérica [8,9].

Rendimiento	40-45%
Exceso enantiomérico	99.9%
Tipo de reactor	Reactor de fibra hueca
Capacidad	40 Kg sustrato/m ² · a ¹
Actividad enzimática	1.6 · 10 ⁵ U/m ²
Estabilidad enzimática	127 h
Fecha de start-up	1993
Localización de producción	Tanabe Seiyaku Co., Japón
Compañía	Tanabe Seiyaku Co. Ltd., Japón

Tabla 2. Parámetros del proceso. (8)

Comparación de la síntesis química y biocatalítica del diltiazem

Con el fin de ejemplarizar las ventajas que posee la biocatálisis respecto a la síntesis química tradicional, que serán desarrolladas con mayor profundidad en la conclusión de este trabajo, se adjunta una figura que compara ambas. Como se puede observar, la síntesis química conlleva más pasos de reacción, lo que conduce a la generación de más subproductos y por consiguiente mayor necesidad de sistemas de eliminación, más contaminación y más costes.

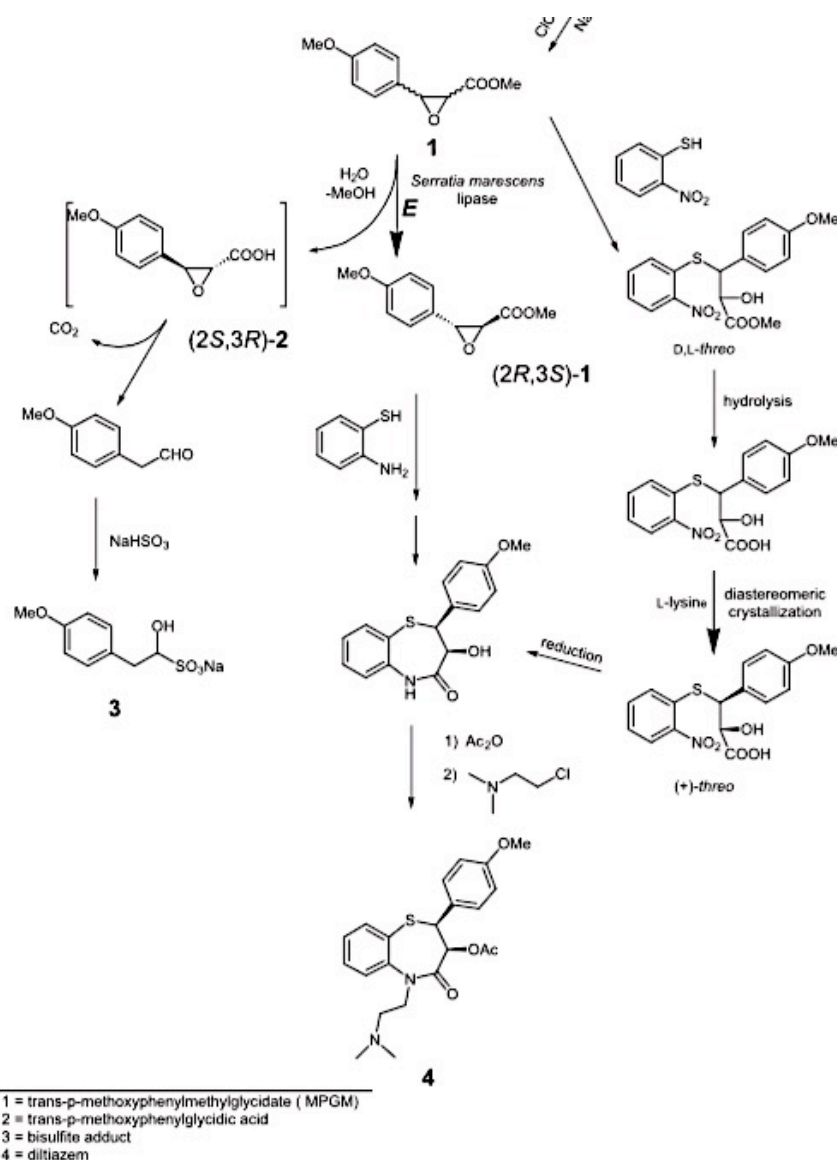


Figura 8. Comparación síntesis química y biocatalítica del diltiazem [8].

Más allá del diltiazem

La biocatálisis también tiene interés en la mejora de las propiedades farmacológicas de la molécula. El mayor inconveniente clínico que tiene el diltiazem es la corta duración de los efectos farmacológicos. Debido a esto, se han buscado modificaciones estructurales que consigan una mayor duración de acción, y así mejorar las propiedades clínicas del fármaco.

Con este fin se ha encontrado que el compuesto **19**, (cis)-3-(acetoxi)-1-[2-(dimetilamonio)etil]-1,3,4,5-tetrahidro-4-(4-metoxifenil)-6-trifluorometil)-2H-1 benzazepin-2-ona, presenta un efecto más prolongado en el tiempo y que además es más potente [13]. Esto quiere decir que, a menores dosis requeridas, la molécula tiene mayores efectos farmacológicos.

La reacción a tratar es llevada a cabo por *Nocardia salmonicolor* SC6310. En este caso, como se puede apreciar, es una reacción biocatalítica que es catalizada por una célula entera, y no por una enzima extraída a partir de un microorganismo. Por ello, tendrá las ventajas ya nombradas en la introducción de esta revisión.

Para la síntesis del compuesto **19** se partió del compuesto **21**, el cual se encuentra como una mezcla de enantiómeros a través de un tautomerismo ceto-enol. En dicho equilibrio predomina la forma cetónica, racemato de **21a** y **21c**. A partir de esta se obtiene el compuesto **20** por medio de una **reducción microbiana estereoselectiva** llevada a cabo por *N. salmonicolor* [13].

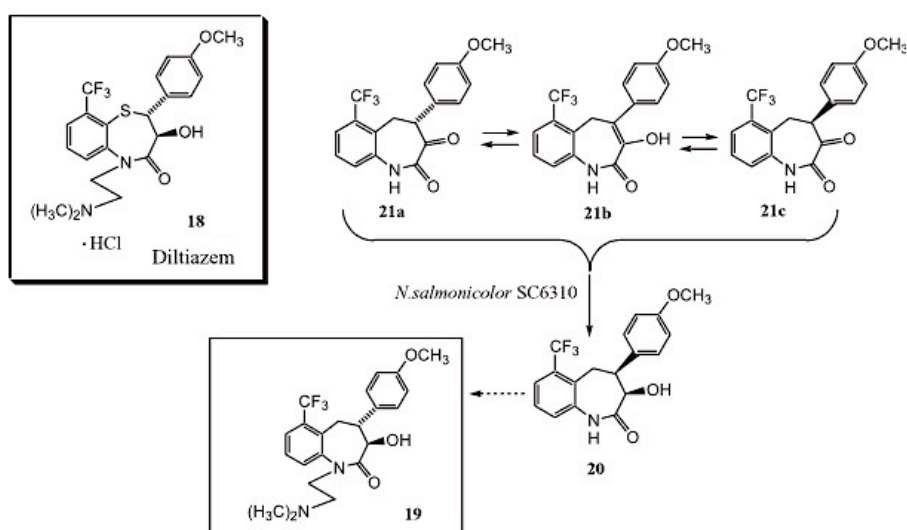


Figura 7. Mejora del diltiazem [13].

Una evaluación de microorganismos condujo a encontrar que *Nocardia salmonicolor* SC6310 es capaz de biocatalizar la transformación selectiva de **21c** a **20** en 96% de rendimiento y 99.8% de exceso enantiomérico, a una concentración de 2g/L de sustrato [14].

CONCLUSIÓN

Se ha comprobado que la biocatálisis es de utilidad en procesos tecnológicos llevados a cabo por la industria química ya que permite la optimización de reacciones que no son fáciles de llevar a cabo por la química convencional o la sustitución de varios pasos químicos por una sola reacción biocatalítica [8].

La ventaja principal que conlleva el uso de biocatalizadores en lugar de catalizadores químicos es la cumplimiento de los principios de la Química Sostenible.

Según Vicente Gotor y María. J. Hernáiz [5]; históricamente, el éxito de una transformación química venía determinado por el rendimiento alcanzado. Sin embargo, el esfuerzo de las agencias mundiales para la protección del medioambiente ha sido el detonante para dar a conocer la importancia de la ‘Química Verde’.

El término **Química Verde** o **Química Sostenible** fue acuñado por Anastas, de la Agencia de Protección ambiental de EE.UU. en 1991. Esta se basa en ‘*el diseño de productos y procesos químicos que reducen o eliminan el uso y producción de sustancias peligrosas.*’ [15]

Según Jose Luis Iborra Pastor [15], la Tecnología Sostenible tiene varias ventajas, entre las que destacan la mayor seguridad respecto a los procesos químicos convencionales; posee un menor coste y además es compatible con un desarrollo sostenible.

Los 12 principios de la Química Verde [15] desarrollan este concepto :

1. La prevención de formación de residuos en lugar de remediación. ‘*Es mejor prevenir que curar*’.
2. La economía atómica, como parámetro que mide el impacto ambiental que produce la obtención de un determinado producto.
3. La reducción de productos químicos tóxicos o peligrosos para el medio ambiente.
4. La generación de productos eficaces pero no tóxicos.
5. La reducción del uso de solventes volátiles y de sustancias auxiliares.
6. La disminución en el consumo energético.
7. La utilización de materias primas renovables.
8. La reducción del número de etapas en los procesos de síntesis.
9. La potenciación de la selectividad de los procesos, en lugar de reacciones estequiométricas.
10. La generación de productos biodegradables.
11. El desarrollo de metodologías analíticas para la prevención de la contaminación.
12. La minimización del riesgo de accidentes químicos.

Por tanto, la Química Sostenible se dirige principalmente al impacto ambiental de los productos químicos y de los procesos por los que se producen.

Para medir la aceptabilidad medioambiental de un determinado proceso químico se utilizan dos magnitudes, el Factor E y la eficacia atómica. El primero de ellos se define como ‘*la relación entre la masa de residuo producido y la del producto obtenido*’ [15]. Es, por tanto,

la cantidad de residuo producido en el proceso de fabricación, a excepción del producto deseado. Es importante matizar que el agua no está incluida en el factor E. A mayor valor del factor E, más residuo se produce, y en consecuencia, mayor es el impacto ambiental negativo (costes de eliminación, contaminación ambiental...). Por tanto, el valor ideal es cero.

Los valores más elevados de Factor E corresponden a los sectores de la química fina y de la Industria farmacéutica; debido a que en este tipo de industrias la síntesis de compuestos, en su gran mayoría, se realiza en procesos multi-etapas; por lo que se genera una enorme cantidad de residuos (gran cantidad de sustratos, disolventes orgánicos y subproductos, entre otros).

Por su parte, la eficacia atómica se calcula dividiendo el peso molecular del producto por la suma de los pesos moleculares de todas las sustancias producidas en la ecuación estequiométrica [15].

Por tanto, como se ha explicado, la Biocatálisis cumple con los principios de la Química Verde, ya que:

- Se emplean **biocatalizadores biodegradables** a los que es fácil de acceder a partir del entorno y que además pueden ser reutilizados. (Principio 7)
- Las reacciones transcurren con una **elevada selectividad** gracias a la precisión enzimática, lo que evita el desarrollo de estrategias sintéticas basadas en el uso de otros productos, por ejemplo para la protección y desprotección de grupos funcionales. Las transformaciones, por tanto, son más simples y seguras. (Principios 1,3,4,5,8, 9 y 12)
- Funcionan en **condiciones** de reacción (presión y temperatura) **suaves**, por lo que la disminución del consumo energético es significativo. (Principio 6)
- Emplean **cantidades catalíticas** de biocatalizador, sin necesidad de recurrir a grandes cantidades de reactivos. Además es posible acoplar sistemas de regeneración de cofactores enzimáticos en procesos que así lo requieran. (Principio 9)
- Presentan una **excelente economía atómica** minimizando la formación de productos secundarios. El factor E es mucho menor que en los procesos químicos convencionales, por lo que la contaminación es mucho menor. (Principio 2)

Debido a todas las ventajas que este tipo de catálisis conlleva, los procedimientos químicos clásicos están siendo reemplazados por las alternativas biocatalíticas más limpias.

Una estimación reciente de las aplicaciones de la biocatálisis en la síntesis orgánica industrial es la comercialización de más de 130 procesos [14].

BIBLIOGRAFÍA

1. Sociedad Española de Biotecnología. www.sebiot.org
2. Hernáiz, M. J. (2012). Biocatálisis aplicada a la síntesis de fármacos (I) Enzimas hidrolíticas. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia.
3. Alcántara, A. R. (2016) *Comunicación personal*.
4. Faber, K. (Sexta edición). (2011). Biotransformations in Organic Chemistry. A textbook. Berlin. Germany. Ed. Springer. [356-363]
5. Gotor Fernández, V. , Hernáiz, M. J. (2017). Biocatálisis aplicada. Las enzimas como herramientas útiles en síntesis orgánica. Monografías de la Academia Nacional de la Química.
6. Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J., Henderson.G. (Séptima Edición). (2012). Rang y Dale. Farmacología. Séptima Edición. Elsevier España S.L.
7. Bezborodov, A. M., Zagustina, N. A. (2013). Lipases in Catalytic Reactions of Organic Chemistry. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2014, 55, pp 313-337. DOI: 10.1134/S0003683814040024
8. Liese A., Seelbach, K., Wandrey, C. (Second, Completely Revised and Extended edition). (2006) *Industrial Biotransformations*. Weinheim, Germany. Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA
9. Alcántara, A. R., Sánchez Montero, J.M. (2009). Utilización de hidrolasas en la preparación de fármacos e intermedios homóquiales. *Monografías de la Real Academia de Farmacia*, 76 (2), 259-305.
10. Aceves Diez, A.E., Castañeda Sandoval, L.M. (2012). Producción biotecnológica de lipasas microbianas, una alternativa sostenible para la utilización de residuos agroindustriales. *Vitae*, 19 (3).
11. Rodrigues, R.C., Fernandez-Lafuente, R. (2010). Review. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 64, 1-22.
12. González-Bacerio, J., Rodríguez Hernández, J., del Monte Martínez, A. (2010). Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. *Rev. Colomb. Biotecnol.* XII (1), 124-140.
13. Luna, H. (2004). Aplicación de la biocatálisis a la aplicación de intermediarios para la síntesis de fármacos. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 48 (003), 211-219.

14. Patel, R.N., Robison, R.S., Szarka, L.J., Kloss, J., Thottathil, J. K., Mueller, R.H. (1991). Enzyme Microb. Technol. 13, pp. 906-912.
15. Iborra Pastor, J.L. (2007). La Esperanza de la Química Verde. Lección Inaugural Curso Académico 2007-2008, Universidad de Murcia, Murcia.